



## بررسی اثر استئوکلسین بر مورفومتری بیضه در مدل آزواسپرمی موش نژاد NMRI

مهسا یعقوبی نژاد، سمیه صلح‌جو، حیدر تولی، عالیه باش‌قره، علی اصغر نوحه‌سرا، طیبه رستگار\*

گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

| چکیده                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | مقاله پژوهشی اصیل                                                                                                                                                                                                                      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>مقدمه</b></p> <p>هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر استئوکلسین بر مورفومتری بافت بیضه در مدل آزواسپرمی موش سوری است.</p> <p><b>مواد و روش‌ها</b></p> <p>جهت انجام این مطالعه گروه‌بندی بصورت زیر انجام شد: گروه کنترل، گروه شم (موش‌هایی که DMSO) حلال بوسولفان و سپس PBS به مدت پنج هفته بعنوان حلال استئوکلسین دریافت کردند) گروه آزواسپرمی - PBS (موش‌های آزواسپرمی که پس از ۵ هفته حلال استئوکلسین به مدت یک ماه دریافت کردند). گروه آزواسپرمی - استئوکلسین (موش‌های آزواسپرمی که پس از گذشت ۵ هفته از دریافت بوسولفان، به مدت ۱ ماه روزانه استئوکلسین (۳ نانوگرم بر گرم بر دسی لیتر) دریافت کردند). گروه آزواسپرمی (بوسولفان ۴۰ میلی گرم/کیلوگرم بصورت تک‌دوز) بصورت داخل صفاقی دریافت کردند، پس از آخرین تزریق بیضه‌ها در محلول بوئن ثابت و پس از رنگ‌آمیزی H&amp;E، آزمون‌های مربوط به مورفومتری صورت گرفت، سپس اطلاعات توسط نرم‌افزار Spss v.16 و آزمون Tukey مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.</p> <p><b>یافته‌ها</b></p> <p>قطر لوله‌های منی‌ساز گروه استئوکلسین دارای افزایش معنی‌داری نسبت به گروه آزواسپرمی می‌باشند (<math>P &lt; 0.05</math>). ضخامت لایه زایا گروه استئوکلسین در مقایسه با گروه آزواسپرمی افزایش معنی‌داری را نشان داد (<math>P &lt; 0.05</math>). تعداد کل سلول‌های لایدیگ و سرتولی و شبه‌عضلاتی تغییرات معنی‌داری را در گروه‌ها نشان ندادند. تعداد کل سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید طویل و اسپرماتید گرد و اسپرماتوگون‌ی در گروه‌های درمان‌شده با استئوکلسین و در مقایسه با گروه‌های آزواسپرمی و آزواسپرمی - PBS افزایش معنی‌داری را نشان داد (<math>P &lt; 0.05</math>).</p> <p><b>نتیجه‌گیری</b></p> <p>استئوکلسین می‌تواند اثرات مخرب بوسولفان را بر سلول‌های اسپرماتوژنیک و اسپرماتوژنز بهبود بخشد.</p> <p><b>کلیدواژه‌ها</b></p> <p>استئوکلسین، مورفومتری بیضه، آزواسپرمی، بوسولفان</p> | <p>تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۴/۲</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۹</p> <p>*نویسنده مسئول: طیبه رستگار، گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران<br/>تلفن: ۰۲۱۸۸۹۵۳۰۰۸<br/>پست الکترونیک: trastegar@sina.tums.ac.ir</p> |



## مقدمه

اسپرماتوژنز فرآیندی است که طی آن، اسپرماتوگونی نابالغ به اسپرماتوزا بالغ (اسپرم) تبدیل می‌شود. انجام صحیح این روند برای باروری مردان ضروری است. لذا اختلال در این روند و یا اختلال در اسپرم از جمله کاهش میزان اسپرم، نقص در حرکت و تغییر در شکل (مورفولوژی) آن ناباروری را به همراه خواهد داشت. یک تخمین جهانی بیان می‌کند که نزدیک به ۷۲/۴ میلیون زوج مشکلات ناباروری را تجربه می‌کنند (۱). در کشور ایران طبق مطالعه سلامت و بیماری انجام شده در سال ۱۳۸۰ شیوع ناباروری ۲/۵ درصد گزارش شده است (۲). میانگین کلی ناباروری در مطالعات نهایی در فاصله سال‌های ۱۳۷۹-۱۳۹۱ در ایران ۱۳/۲ درصد گزارش شد. همچنین شیوع کلی ناباروری در ایران به آمار جهانی بسیار نزدیک است (۳).

ناباروری در مردان در ۱۰-۲۰ درصد موارد بعلت آزواسپرمی و بطور معمول به علت اختلالات سیستم تناسلی است. بطور معمول جمعیت مردان آزواسپرمی حدود ۲ درصد تخمین زده شده است (۶) و نشان داده شده‌است که در ۲۰ درصد مردان نابارور، آزواسپرمی علت اصلی ناباروری می‌باشد (۴). آزواسپرمی غیرانسدادی حالتی است که در انزال هیچ اسپرمی مشاهده نمی‌شود و مربوط به اختلالات داخل بیضه-ای و در نتیجه اختلال در اسپرماتوژنز می‌باشد، در حالیکه در آزواسپرمی انسدادی اسپرماتوژنز طبیعی بوده و نقص مربوط به انسداد در مجاری انزالی می‌باشد (۵).

در بیضه و در روند اسپرماتوژنز چهار نوع سلول اصلی دخیل می‌باشند: سرتولی، لایدیگ، سلول‌های زایا، سلول‌های شبه-عضلانی اطراف لوله‌ای، از طرفی بیضه دارای دو فعالیت اصلی می‌باشد: تولید هورمون‌های استروئیدی (استروئیدوژنز)

و تولید اسپرماتوزوا (اسپرماتوژنز) که حاصل همکاری بین سلول‌های مذکور می‌باشد (۶). استروئیدوژنز توسط سلول‌های لایدیگ صورت می‌گیرد و اسپرماتوژنز درون لوله‌های منی‌ساز صورت می‌گیرد (۷). سلول‌های سرتولی اولین نوع سلول‌هایی می‌باشند که در طول دوره تکاملی تمایز می‌یابند. نتیجه این اتفاق، تکامل لوله‌های اسپرم ساز، جلوگیری از ورود سلول‌های بنیادی به تقسیم میوز و تکثیر آن‌ها و شروع فعالیت سلول‌های لایدیگ می‌باشد (۸و۹). سلول‌های سرتولی قبل از سن بلوغ در پاسخ به میزان کم تستوسترون، آنتی مولرین هورمون تولید می‌کنند که سبب تحلیل رفتن لوله‌های مولرین می‌گردد، همچنین این سلول‌ها محرک فرایند تولید هورمون‌های استروئیدی توسط سلول‌های لایدیگ می‌باشند. مورفولوژی ویژه سلول‌های سرتولی برای اسپرماتوگونی‌های متحمل میتوز، اسپرماتوسیت‌های دستخوش میوز و اسپرماتیدهایی که وارد فرایند اسپرماتوژنز شده‌اند نقش حفاظتی ایفا می‌کند. سلول‌های سرتولی با ایجاد سدخونی-بیضه‌ای محیط مناسب برای تکامل سلول‌های بنیادی ایجاد می‌کنند (۸و۹).

در روند باروری هورمون‌های زیادی اثرگذارند که تستسترون و استروژن تنظیم کننده‌های ضروری آن می‌باشند (۴) و اخیراً هورمون دیگری که بر روند اسپرماتوژنز مؤثر اعلام شده، هورمون استئوکلسین می‌باشد. استئوکلسین توسط سلول‌های استئوبلاست آزاد می‌شود و به عنوان عاملی در تغییر و تبدیل مجدد (turnover) استخوان شناخته شده است که در باروری در مدل‌های موشی دستکاری ژنی شده (Transgenic) توسط بالا بردن تولید تستسترون و تعداد اسپرم مؤثر است (۱۰). استئوکلسین از طریق اتصال به G پروتئین منجر به افزایش ترشح تستسترون توسط سلول‌های



لايدیگ شده و ازین طریق نقش مهمی را در کنترل باروری مردان ایفا می‌کند (۱۱و۱۶و۱۸-۲۰). استئوکلستین بطور مستقیم تولید تستسترون را توسط سلول‌های لایدیگ در بیضه کنترل می‌کند و گیرنده هورمون تستسترون در سلول سرتولی قرار دارد (۴). با توجه به نتایج به دست آمده در مقالات می‌توان استخوان را به عنوان یک عضو اندوکرینی دانست (۱۸و۱۹و۲۳) و با توجه به اثر هورمون استئوکلستین بر گیرنده‌های سلول‌های لایدیگ و ترشح تستسترون و لذا در این مطالعه نقش استئوکلستین بر مورفولوژی لوله‌های منی‌ساز و سلول‌های زایا در مدل موشی آزواسپرمیک مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته‌است.

### مواد و روش‌ها

طرح حاضر از نوع تجربی می‌باشد و در نیمه‌ی دوم سال ۱۳۹۵ در آزمایشگاه جنین‌شناسی گروه آناتومی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد، برای انجام این طرح از موش‌های نر ۴-۶ هفته‌ای نژاد NMRI استفاده شد. موش‌ها از حیوان‌خانه دانشکده داروسازی (دانشگاه تهران) خریداری و در شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت یک هفته در دمای  $20 \pm 2$  درجه سانتیگراد و تغذیه با غذای کنسانتره مخصوص موش تهیه شده از موسسه رازی و آب کافی نگهداری می‌شدند پس از سازگاری موش‌ها با شرایط آزمایشگاه، تحقیق بر روی موش‌ها آغاز گردید. مقررات و قوانین مربوط به نگهداری و کار با حیوانات آزمایشگاهی براساس مصوبات کمیته اخلاق دانشگاه تهران رعایت گردید. سپس موش‌ها به‌طور تصادفی گروه‌بندی شدند (هر گروه شامل ۵ حیوان)

گروه کنترل: (هیچ مداخله‌ای صورت نگرفت)، گروه شم (شامل موش‌هایی که (DMSO) حلال بوسولفان و پس از ۵ هفته حلال استئوکلستین (PBS) به مدت پنج هفته دریافت

کردند)، گروه آزواسپرمی (موش‌هایی که بوسولفان (۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم) بصورت داخل صفاقی دریافت کردند)، گروه آزواسپرمی-PBS (موش‌های آزواسپرمی که پس از گذشت ۵ هفته از دریافت بوسولفان، حلال استئوکلستین (PBS) را به مدت یک ماه دریافت کردند). گروه آزواسپرمی- استئوکلستین (شامل موش‌های آزواسپرمی می‌باشد که به مدت ۱ ماه استئوکلستین (۳ نانوگرم بر گرم بر دسی لیتر) دریافت کردند (۱۱).

### تهیه مدل آزواسپرمی

با توجه به اینکه سن باروری در موش از ۴-۶ (۱) هفته شروع می‌شود و دوره اسپرماتوژنز در موش ۵ هفته به طول می‌انجامد لذا ابتدا به موش‌های ۴-۶ هفته به میزان ۴۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بوسولفان بصورت داخل صفاقی تزریق و پس از ۵ هفته جهت تایید مدل، بیضه‌ها خارج و پاساژ بافتی انجام شد. تهیه مدل آزواسپرمی با استفاده از بوسولفان از طریق روش ارائه شده توسط غلامی و همکاران انجام گرفت (۱۲) لازم به ذکر است پودر بوسولفان در محلول DMSO حل گردید، بعد از بدست آمدن محلول شفاف به میزان لازم PBS اضافه شد.

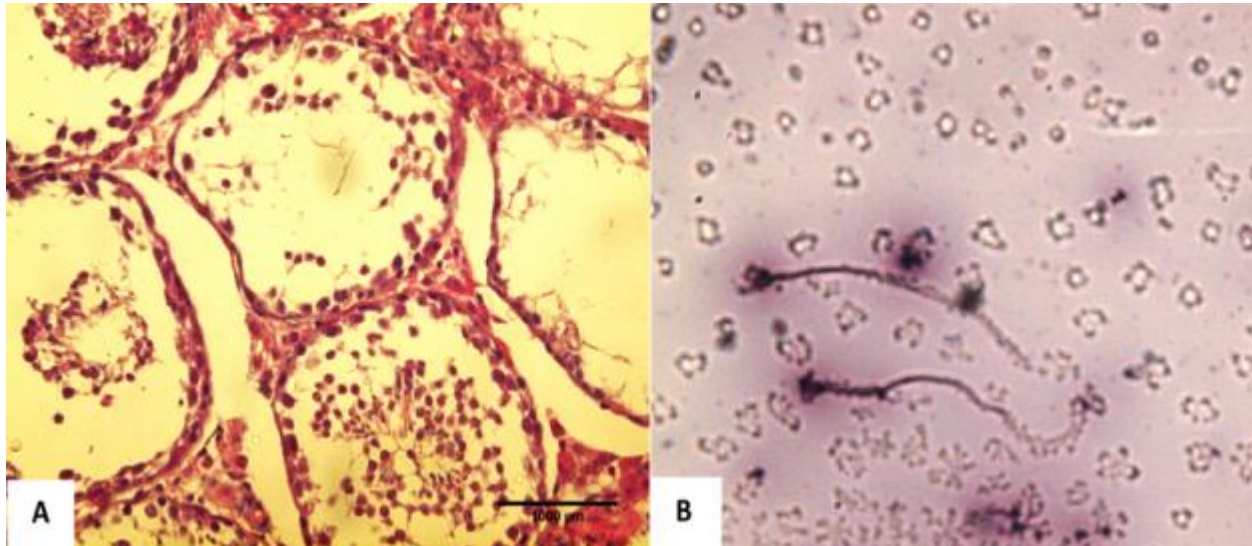
### تایید مدل آزواسپرمی

جهت تایید مدل آزواسپرمی از رنگ‌آمیزی ائوزین-نگروزین استفاده شد. برای این منظور موش‌ها بوسیله مخلوط کتامین ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلین ۱۰ میلی-گرم/کیلوگرم کشته شدند، سپس قسمتی از اپی‌دیدیم جدا شده و پس از قطعه قطعه شدن یک قطره از مایع منی با دو قطره از ائوزین Y ۱ درصد مخلوط شد پس از ۳۰ ثانیه ۳ قطره نیگروزین ۱۰ درصد به مخلوط اضافه شد و به خوبی ترکیب شدند. سپس به منظور تهیه گستره، یک قطره از مخلوط را بر روی یک لام شیشه‌ای تمیز قرار داده شد و



رنگ صورتی و اسپرم زنده بی‌رنگ شمارش شدند (۱۳).

گستره تهیه شده در دمای محیط خشک شد. لام تهیه شده توسط میکروسکوپ فاز کنتراست بررسی شد. اسپرم مرده به



شکل - (A) رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین مقطع عرضی گروه آزواسپرمی (B) رنگ آمیزی ائوزین نگروژین، اسپرم‌های مرده که رنگ صورتی گرفته‌اند. بزرگنمایی  $\times 1000$ .

از خارج شدن به سرعت جهت ثابت شدن در محلول بوئن در طول یک شب قرار داده شدند. بافت‌ها درون کپسول‌های منفذدار قرار داده شده سپس مراحل آب‌گیری، شفاف‌سازی، نفوذ و آغشتگی با استفاده از دستگاه پاساژ بافتی خودکار انجام شد. سپس بافت‌ها درون قالب‌های لوک هارد قرار داده شدند و با پارافین مذاب قالب‌گیری شدند. جهت تهیه مقاطع از میکروتوم چرخشی استفاده شد و مقاطعی به ضخامت ۵ میکرومتر تهیه شد، نوار بافتی تهیه شده جهت باز شدن چروکیدگی درون حمام آب شناور شد و سپس بر روی لام قرار داده شد.

#### رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین

این رنگ آمیزی با هدف اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، اندازه‌گیری ضخامت لایه زایا، شمارش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و طویل، تعداد

همچنین پس از تهیه برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون و گذراندن مراحل پاساژ بافتی، رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین از بیضه‌ی موش‌های تحت درمان با بوسولفان به منظور ارزیابی مدل آزواسپرمی پس از گذشت ۵ هفته از تزریق بوسولفان صورت گرفت و لوله‌های منی‌ساز از نظر مورفولوژی و حضور سلول‌های زایا بررسی شدند.

در پایان مطالعه، حیوان‌ها وزن شدند و بوسیله مخلوط کتامین ۵۰ میلی‌گرم/کیلوگرم و زایلین ۱۰ میلی - گرم/کیلوگرم هایپر دوز کشته شدند. سپس بیضه چپ خارج گردید و پس از پاکسازی این بافت از چربی وزن آن‌ها ثبت گردید. سپس عضو جهت بررسی تغییرات بافتی که در زیر

به آن اشاره می‌شود تحت مراحل پاساژ بافتی و قرار گرفت. به منظور حفظ بافت در برابر آنزیم‌های تخریبی و حفظ ساختمان طبیعی و سخت نمودن آن بافت‌ها بلافاصله بعد



میکروسکوپ نوری المپیوس CX31 ساخت ژاپن ( Olympus, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند و تصاویر تهیه شده با بزرگنمایی  $40\times$  توسط دوربین olympus E-30 بوسیله نرم-افزار imagej ۱/۴۶ و تعداد سه field of view از هر لام مورد شمارش و اندازه‌گیری قرار گرفت.

### آنالیز آماری

جهت انجام مطالعات کمی از نرم‌افزار Image J 1/۴۶ استفاده شد. سپس اطلاعات با استفاده از One way ANOVA، نرم‌افزار Spss v.16 و آزمون Tukey بعلت دارا بودن دقت بالا و ایجاد امکان مقایسه گروه‌ها بصورت دوجه دو سطح معنی‌داری  $P \leq 0/05$  مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

### یافته‌ها

وزن بدن و بیضه‌ی چپ موش: وزن بدن در بین هیچ‌یک از چهارگروه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). در حالیکه در وزن بیضه چپ در گروه تیمار شده با استئوکلستین درمقایسه با گروه آزواسپرمی افزایش معنی-داری ( $P \leq 0/001$ ) مشاهده شد. در وزن بیضه چپ در گروه آزواسپرمی نسبت به گروه کنترل کاهش معنی‌داری مشاهده شد ( $P \leq 0/001$ ).

سلول‌های سرتولی، میوئید و تعداد سلول‌های لایدیگ صورت گرفت، همچنین برای شمارش هسته‌ها از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین استفاده شد. به منظور پارافین‌زدایی، برش‌ها از دو مرحله گزلیل عبور داده شدند. سپس برش‌ها در الکلی مطلق و الکلی‌هایی با درجات پایین‌رونده و نهایتاً در آب مقطر قرار داده شدند (آبدهی‌کردن) سپس برش‌ها در محلول رنگ هماتوکسیلین قرار داده شده و در آب جاری به مدت ۲-۳ دقیقه شست‌وشو داده شدند. برش‌ها در محلول ائوزین ۱ درصد به مدت ۱-۳ دقیقه قرار داده شدند بعد از آن به ظرف حاوی آب مقطر قرار داده شدند به منظور آب‌گیری برش‌ها در الکلی ۷۰ و سپس درجات بالا رونده قرار داده شدند و بعد از آن در گزلیل با دو تغییر قرار داده شدند.

### مورفومتري لوله‌های اسپرم ساز

به منظور شمارش سلول‌های زایا و اندازه‌گیری قطر لوله‌های منی‌ساز، اندازه‌گیری ضخامت لایه زایا (فاصله غشا پایه تا حد لومینار لوله‌های اسپرم ساز)، شمارش تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی، اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و طویل، تعداد سلول‌های سرتولی، میوئید و تعداد سلول‌های لایدیگ در همه گروه‌ها از موش‌ها، سه لام از هر بیضه تهیه شد و مقاطع رنگ‌آمیزی شده با هماتوکسیلین-ائوزین با استفاده از

جدول ۱- میانگین وزن بیضه چپ و وزن بدن

| گروه‌های آزمایش       | وزن بدن           | وزن بیضه چپ          |
|-----------------------|-------------------|----------------------|
| کنترل                 | $45/14 \pm 0/9^a$ | $0/16 \pm 0/03^c$    |
| آزواسپرمی-استئوکلستین | $42/66 \pm 3/7^a$ | $0/14 \pm 0/03^{bc}$ |
| شم                    | $43/64 \pm 1/5^a$ | $0/14 \pm 0/01^{bc}$ |
| آزواسپرمی             | $39/96 \pm 0/4^a$ | $0/05 \pm 0/02^a$    |
| آزواسپرمی-PBS         | $41 \pm 3^a$      | $0/08 \pm 0/01^{ab}$ |
| P-value               | $\leq 0/05$       | $\leq 0/05$          |

آزمون oneway anova، حروف هم‌شکل عدم معنی‌داری، حروف غیر هم‌شکل معنی‌داری را در سطح  $0/05$  نشان می‌دهد



ضخامت لایه‌ی زایا در گروه‌های آزواسپرمی ( $90/33 \pm 45/8$ ) میکرومتر) و آزواسپرمی-PBS ( $67/05 \pm 36/4$ ) میکرومتر) کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه کنترل نشان داد و نیز تغییرات چشمگیری در این متغیر در بین گروه‌های کنترل، درمان‌شده با استئوکلسین ( $150/57 \pm 65/2$ ) میکرومتر) و گروه شم ( $171/32 \pm 22/7$ ) میکرومتر) مشاهده نشد.

اندازه‌گیری‌های انجام شده نشان دادند که قطر لوله‌های منی‌ساز در گروه آزواسپرمی ( $567/95 \pm 75/1$ ) میکرومتر)، کاهش معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را نسبت به گروه کنترل ( $690/25 \pm 77/7$ ) میکرومتر) نشان داد. قطر لوله‌های منی‌ساز در بین گروه‌های کنترل، درمان‌شده با استئوکلسین ( $636/56 \pm 73/4$ ) میکرومتر) و شم ( $651/41 \pm 60/6$ ) میکرومتر) تغییرات قابل ملاحظه‌ای ( $P < 0/05$ ) را نشان نداد (جدول ۲).

جدول ۲- میانگین قطر لوله‌های منی‌ساز و ضخامت لایه زایا

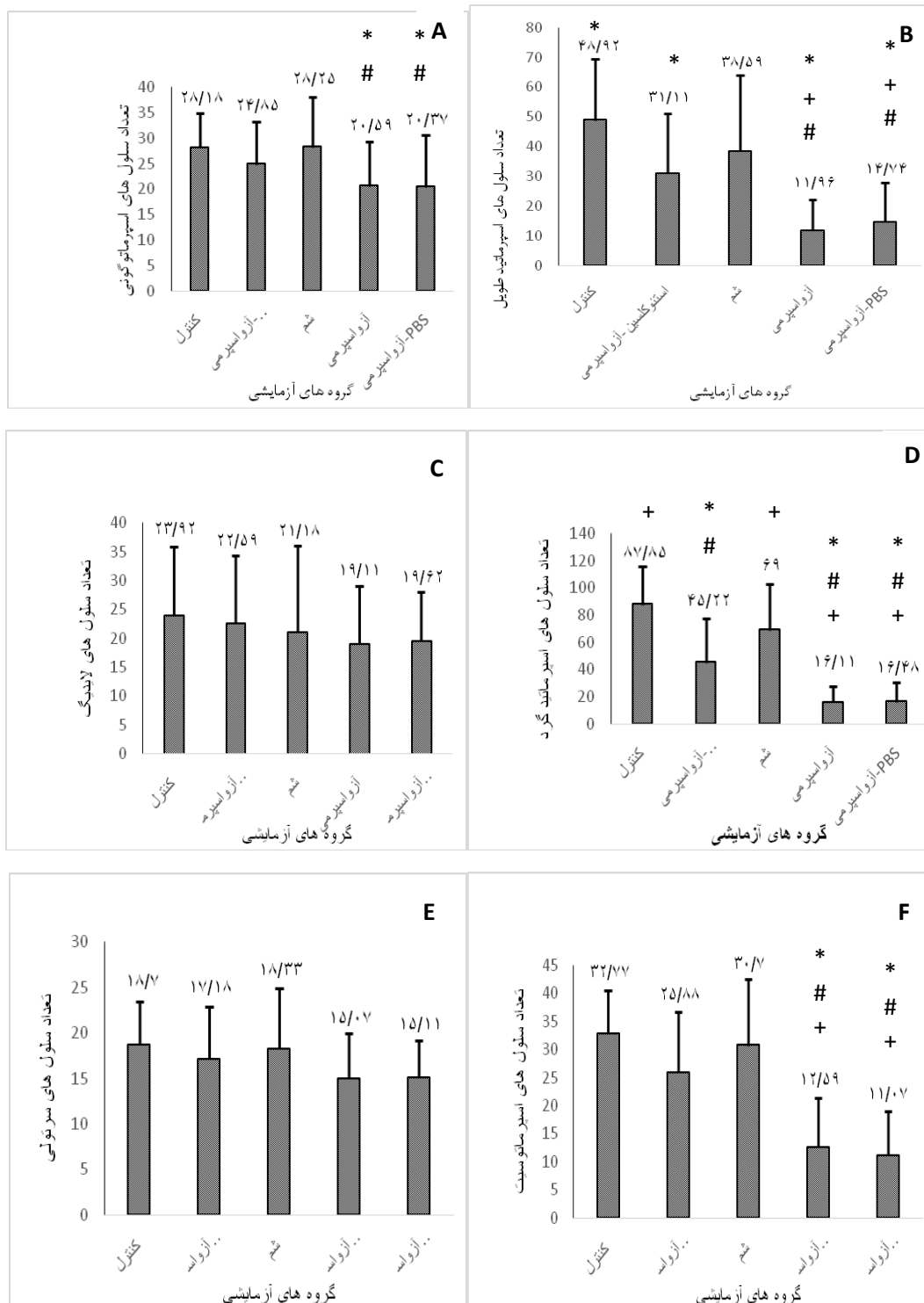
| گروه‌های آزمایش      | ضخامت لایه‌ی زایا (میکرومتر) | قطر لوله منی‌ساز (میکرومتر) |
|----------------------|------------------------------|-----------------------------|
| کنترل                | $210/82 \pm 47/23^c$         | $690/25 \pm 77/7^c$         |
| آزواسپرمی-استئوکلسین | $150/57 \pm 65/2^b$          | $636/56 \pm 73/4^c$         |
| شم                   | $171/32 \pm 22/7^b$          | $651/41 \pm 60/6^c$         |
| آزواسپرمی            | $90/33 \pm 45/8^a$           | $567/95 \pm 75/1^b$         |
| آزواسپرمی-PBS        | $67/05 \pm 36/4^a$           | $458/57 \pm 84^c$           |
| P-value              | $\leq 0/05$                  | $\leq 0/05$                 |

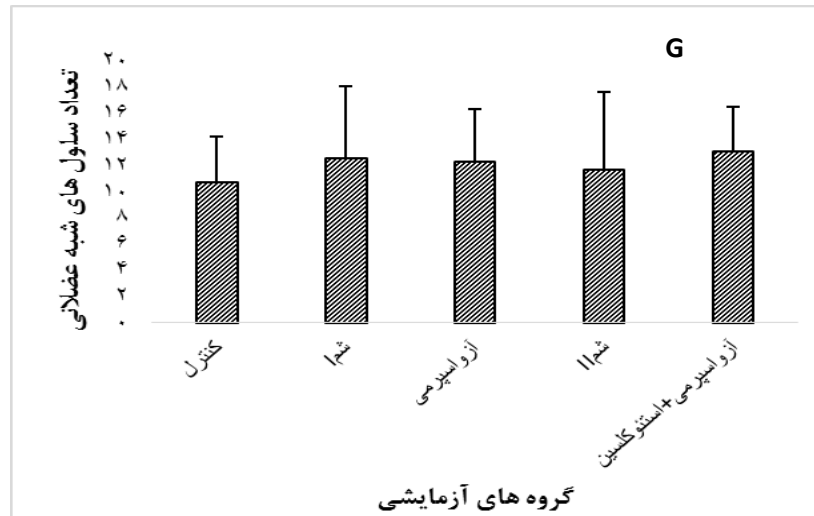
آزمون oneway anova، حروف هم‌شکل عدم معنی‌داری، حروف غیر هم‌شکل معنی‌داری را در سطح  $0/05$  نشان می‌دهد

اسپرماتوسیت ( $P < 0/05$ )، اسپرماتید طولی ( $P < 0/05$ ) و اسپرماتید گرد ( $P < 0/05$ ) شمارش شده در گروه‌های درمان‌شده با استئوکلسین و گروه شم در مقایسه با گروه‌های آزواسپرمی و آزواسپرمی-PBS تفاوت معنی‌داری را نشان داد و نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (نمودار ۱).

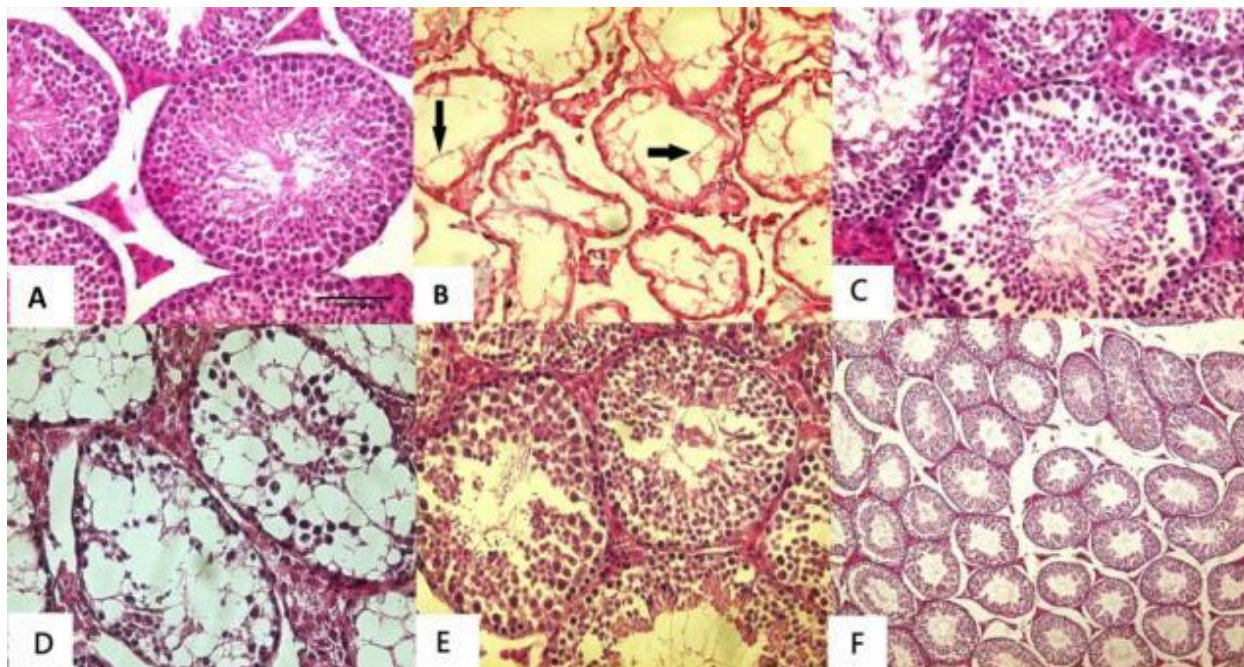
### شمارش تعداد سلول‌های لایه زایا و بافت بینابینی

بر اساس نمودار شماره ۱ صورت گرفته براساس آزمون one way anova و طی آزمون تعقیبی Tokey ( $P < 0/05$ )، تعداد کل سلول‌های لایدیگ و سرتولی و شبه‌عضلانی و اسپرماتوگونی شمارش شده تفاوت معنی‌داری ( $P < 0/05$ ) را در بین گروه‌ها نشان ندادند. تعداد کل سلول‌های





شکل ۱- میانگین تعداد سلول های شمارش شده در لایه ی زایا. تعداد سلول های اسپرماتوگونی شمارش شده در هر گروه آزمایش (A)، تعداد سلول های اسپرماتید طویل شمارش شده (B)، تعداد سلول های لایدیگ (C)، تعداد سلول های اسپرماتید گرد (D)، تعداد سلول های سرتولی (E)، تعداد سلول های اسپرماتوسیت (F)، تعداد سلول های شبه عضلانی، (G) استئوکلستین افزایش معناداری را در بین سلول های اسپرماتید طویل و گرد و اسپرماتوسیت و اسپرماتوگونی شد، درحالی که تعداد سلول های لایدیگ، سرتولی، شبه عضلانی تغییرات معناداری را نشان ندادند. \* معنی داری در مقایسه با گروه کنترل، # معنی داری در مقایسه با گروه آزواسپرمی - PBS، + معنی داری در مقایسه با گروه آزواسپرمی - استئوکلستین.



شکل ۲- رنگ آمیزی هماتوکسیلین- انوزین (A) مقطع عرضی بافت بیضه گروه کنترل با اسپرماتوزن نرمال و لایه زایای ضخیم. (B) مقطع عرضی بافت بیضه گروه شم II، حضور واکوئول‌ها (فلش‌ها) و آپوپتوز (C) مقطع عرضی بافت بیضه گروه شم I (D) گروه تیمار شده با بوسولفان، لوله‌ها بطور نسبی خالی و واکوئول‌دار هستند. عدم حضور سلول‌های لایه زایا نشان‌دهنده تخریب اسپرماتوزن می‌باشد. (E) گروه آزمایش، لایه زایای ضخیم و حضور انواع سلول‌های زایا نشان‌دهنده بهبود و حضور اسپرماتوزن است. (F) تصویر لوله‌های منی‌ساز گروه استئوکلسین با بزرگنمایی ۱۰۰×

## بحث

در مطالعه انجام شده تفاوت‌های ظاهری از جمله عدم نزول بیضه، تغییر در شکل مجاری ناقل اسپرم در بین موش‌های هیچ‌کدام از گروه‌ها مشاهده نشد، همچنین چانگ<sup>۱</sup> و همکاران بیان کردند که در شکل ظاهری اعضای ادراری تناسلی و وزن بدن موش‌ها تفاوتی بین گروه‌های نرمال و گروه‌هایی که آندروژن رسپتورهای سلول‌های سرتولی ناک-اوت شده بود تفاوتی مشاهده نشد (۸). در این مطالعه وزن بیضه، ضخامت لایه زایا و قطر لوله‌های منی‌ساز بطور قابل توجهی در گروه‌های تحت درمان با بوسولفان کاهش یافت (۱۴و۸). یافته‌های اوری نشان دادند که در موش‌های دارای نقص تولید استئوکلسین (Ocn-/-) اندازه بیضه‌ها،

در این مطالعه اپیتلیوم لوله‌های زایا در موش‌های آزواسپرمی تخریب شد و نشان داده شد که استئوکلسین می‌تواند این نقص را بهبود بخشد، تزریق استئوکلسین به مدت یک ماه روزانه انجام شد. بوسولفان منجر به القای مدل آزواسپرمی و اختلال در اسپرماتوزن می‌شود که استئوکلسین می‌تواند این نقیصه را بهبود بخشد (۸و۱۴). در مطالعه صورت گرفته ساختمان لوله‌های منی‌ساز در گروه درمان شده با بوسولفان دچار بهم ریختگی در ساختار شدند و واکوئول‌های زیادی در اپیتلیوم لایه زایا مشاهده شد که بر اساس مطالعه میرحسینی و همکاران نشان دهنده بروز آپوپتوز در سلول‌های سازنده این لایه است (شکل ۲) (۱).

<sup>۱</sup>Chang



اپی دیدیم و وزن سمینال وزیکل آن‌ها کاهش پیدا می‌کند (۱۵).

در حالیکه در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۶ توسط ونگ<sup>۱</sup> و همکاران انجام شد بیان شد که وزن بیضه و آرایش سلول‌های بنیادی در بین موش‌های گروه کنترل و دستکاری ژنتیکی شده یکسان است (۶). در مطالعه حاضر تغییری در تعداد سلول‌های لایدیگ و سرتولی در گروه دریافت‌کننده بوسولفان در مقایسه با گروه‌های دیگر مشاهده نشد، در حالیکه اوری<sup>۲</sup> بیان کرد که در رشد سلول‌های لایدیگ موش‌هایی که گیرنده استئوکلستین در آن‌ها ناکاوت شده بود (Ocn-/-) کاهش مشاهده شد (۱۵). همچنین دهقانی و همکاران در مطالعه‌ای بیان کردند که بوسولفان منجر به بهم‌ریختگی سلول‌های سرتولی می‌شود اما بر تعداد آن‌ها تاثیری ندارد (۱۴ و ۱۶). همچنین نتایج بدست آمده توسط ونگ و همکاران نشان داد که هسته سلول‌های سرتولی در گروه آزواسپرمی دچار بهم‌ریختگی می‌شود در صورتیکه در مطالعه اخیر بهم‌ریختگی در موقعیت هسته سلول‌های سرتولی مشاهده نشد (شکل ۲) و هسته‌ها در قسمت قاعده لوله اسپرم‌ساز قرار داشتند (۶). همچنین در سال ۲۰۱۱ اسمیت<sup>۳</sup> و همکارانش برای حمایت از این داده‌ها در شرایط (invivo) دو مدل موشی را که در آن عملکرد استئوکلستین قطع شده بود یا عملکرد آن افزایش یافته بود را با گروه کنترل مقایسه کردند و دریافتند که وزن بیضه‌ها، میزان اسپرم و سطح تستسترون در حال گردش بطور چشمگیری در موش‌هایی که استئوکلستین در آن‌ها ناکاوت شده بود کاهش پیدا کرد (۴).

در مطالعه اخیر تعداد سلول‌های اسپرماتوسیت، اسپرماتید گرد و اسپرماتید طویل شده در موش‌های گروه آزواسپرمی- استئوکلستین در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری را نشان دادند و نیز در مطالعه صورت گرفته توسط دجنت<sup>۴</sup> و همکاران به اثر تخریبی بوسولفان بر این سلول‌ها اشاره شد (۱۶)، همچنین در تعداد سلول‌های اسپرماتوگونی تغییرات معنی‌داری مشاهده شد. تصویر ۱ نشان دهنده اثر تخریبی بوسولفان بر سلول‌های زایا است. واکوئول‌های بوجود آمده در اپیتلیوم زایا بیانگر آپوپتوز در سلول‌های زایا و ازهم-گسیختگی آن‌ها می‌باشد (۱)، همچنین چانگ و همکاران به موضوع افزایش آپوپتوز در سلول‌های اسپرماتوسیت اشاره کردند که در این مطالعه استئوکلستین از بروز آپوپتوز در بین سلول‌های زایا جلوگیری کرد (۸).

مطالعات بسیاری استخوان را به عنوان یک عضو اندوکرینی در نظر گرفته‌اند (۱۱ و ۱۷-۱۹) که بواسطه تولید استئوکلستین و اتصال به گیرنده‌های G پروتئین منجر به افزایش سلول‌های لایدیگ و در نتیجه افزایش ترشح تستسترون بواسطه این سلول‌ها می‌شود و ازین طریق نقش مهمی را در کنترل باروری مردان ایفا می‌کنند (۴ و ۱۱ و ۱۸-۲۰). اوری بیان کرد که استئوکلستین نقش اساسی در تنظیم هموستاز گلوکوز و متابولیسم دارد در نتیجه این هورمون می‌تواند تولید تستسترون را تحت تاثیر قرار دهد، جهت آزمایش این فرضیه مطالعات invivo نشان دادند که موش‌های ماده Ocn-/- دارای قدرت باروری نرمال بودند، در حالیکه موش‌های نر جهش‌یافته قدرت باروری ضعیفی داشتند. همچنین هورمون استئوکلستین در فرم undercarboxylated آن تکثیر سلولی، ترشح انسولین و

<sup>۱</sup>Wang<sup>۲</sup>Oury<sup>۳</sup>Smith<sup>۴</sup>De Gendt



حساسیت به انسولین در عضله، کبد و سلول‌های چربی سفید را افزایش می‌دهد (۱۵).

شوئتز<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۱۳ بیان کردند که استئوکلستین بر تولید تستسترون توسط سلول‌های لایدیگ اثر می‌گذارد (۲۱ و ۱۰). مطالعات بسیاری حضور استئوکلستین را در یکپارچه نگه‌داشتن توده استخوانی در اسکلت مردان و زنان در طول دوره بلوغ از طریق افزایش تستسترون ضروری دانستند، یکپارچگی و رشد استخوان در هر دو جنس تحت تاثیر هورمون‌های استروئیدی تولیدشده توسط گنادها می‌باشد، از جمله بارزترین مثال در این زمینه عارض شدن پوکی استخوان در زنان یائسه به دنبال کاهش عملکرد گنادها است (۱۸ و ۹). در سال ۲۰۱۳ اوری<sup>۲</sup> و همکاران در ارتباط با نقش استئوکلستین بر تکوین مغز و عملکرد آن بیان کردند که این ماده از طریق نقش مهاری خود بر GABA منجر به بهبود حافظه و یادگیری می‌شود. همچنین بیان کردند که استئوکلستین مادری با عبور از جفت از آپوپتوز نورونی جلوگیری می‌کنند (۱۱ و ۹).

در مطالعه انجام شده وزن بدن موش‌های گروه تیمار شده با استئوکلستین در مقایسه با گروه آزواسپرمی تغییرات معنی‌داری را نشان نداد. در مطالعات ذکر شده مدل‌های حیوانی نشان می‌دهد که استئوکلستین واسطه تنظیم گلوکز و سوخت و ساز چربی است (۲۵ و ۱۸) و نیز اظهار داشتند که استئوکلستین و آندروژن ارتباط معکوسی با شاخص توده بدنی (BMI) دارند (۲۶).

کارسنتی و همکاران بیان کردند که استئوکلستین از طریق محور پانکراس- استخوان- بیضه که بطور مستقل کنترل می‌شود در موازات با محور هیپوتالاموس-هیپوفیز- بیضه در

سیستم تناسلی مردان به القا بیوسنتز تستسترون کمک می‌کند که اصلی‌ترین محور اندوکرینی تنظیم کننده باروری مردان محور اخیر می‌باشد. بدین صورت که مسیر پیام‌دهی انسولین بر سلول‌های استئوبلاست اثر تحریکی و استئوبلاست فعال شده استئوکلاست را فعال کرده و در نتیجه افزایش pH توسط استئوکلاست، استئوکلستین کربوکسیله (غیرفعال) موجود در ماترکس خارج سلولی استخوان را به فرم فعال آن (undercarboxylated form) تبدیل می‌کند، که بدنبال آن فرم فعال استئوکلستین (undercarboxylated form) با اثر بر سلول‌های بتای پانکراس باعث تحریک تولید انسولین، افزایش حساسیت به انسولین توسط بافت‌های محیطی و تولید تستسترون توسط سلول‌های لایدیگ بیضه می‌شود، در مقابل تستسترون منجر به حفظ و بلوغ بافت استخوانی می‌شود در نتیجه استئوکلستین بعنوان هورمونی با فعالیت دو جانبه از طریق اثر بر سلول‌های بتا پانکراس و سلول‌های لایدیگ در بیضه فعالیت می‌کند (۲۷).

### نتیجه‌گیری

حفظ عملکرد غدد جنسی مرد به عنوان یکی از نگرانی‌های اساسی نجات‌یافتگان از سرطان، یکی از رویکردهای پژوهشی است. بوسولفان بعنوان یکی از داروهای مورد استفاده در شیمی‌درمانی اثرات مخربی بر اسپرماتوژنز داشته و منجر به کاهش قدرت باروری در مردان می‌شود. با توجه به در نظر گرفتن استخوان به عنوان یک عضو اندوکرین فعالیت‌های گوناگونی را بدن کنترل می‌کند (۲۷). با نظر بر اینکه بدنبال افزایش سن میزان تستسترون تولیدی و تعداد اسپرم مایع منی کاهش پیدا می‌کند، همچنین میزان چربی زاید بدن افزایش می‌یابد، در نتیجه هورمون استئوکلستین تولیدی توسط استخوان را با توجه به اثر این هورمون بر سطح تستسترون و چربی بدن بعنوان هورمون ضدپیری می‌توان

<sup>۱</sup>Schwetz

<sup>۲</sup>Oury



شناسی لوله‌های منی‌ساز آسیب‌دیده و فرآیند اسپرماتوژنز  
در مدل‌های موشی آزواسپرمی شد.

در نظر گرفت (۱۵) با توجه به اثرگذاری آن بر سلول‌های  
لایدیگ و بافت بیضه موجب بهبود قابل توجهی در بافت-

## References

1. Mirhoseini M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Asl JM. Melatonin and testicular damage in busulfan treated Mice. *Iran Red Crescent Med J* 2014;16(2):e14463.
2. Hodžić A, Ristanović M, Zorn B, Tulić C, Maver A, Novaković I, *et al.* Genetic variation in circadian rhythm genes CLOCK and ARNTL as risk factor for male infertility. *PloS one* 2013;8(3):e59220.
3. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, *et al.* The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. *Fertil Steril* 2009;92(5):1520-4.
4. Smith LB, Saunders PT. The skeleton: the new controller of male fertility? *Cell* 2011;144(5):642-3.
5. Gudeman SR, Townsend B, Fischer K, Walters RC, Crain D. Etiology of azoospermia in a military population. *J Urol* 2015;193(4):1318-21.
6. Wang R-S, Yeh S, Chen L-M, Lin H-Y, Zhang C, Ni J, *et al.* Androgen receptor in Sertoli cell is essential for germ cell nursery and junctional complex formation in mouse testes. *Endocrinology* 2006;147(12):5624-33.
7. Jensen MB. Vitamin D and male reproduction. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10(3):175-86.
8. Chang C, Chen Y-T, Yeh S-D, Xu Q, Wang R-S, Guillou F, *et al.* Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(18):6876-81.
9. Xu Q, Lin H-Y, Yeh S-D, Yu I-C, Wang R-S, Chen Y-T, *et al.* Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells. *Endocrine* 2007;32(1):96-106.
10. Schwetz V, Gumpold R, Graupp M, Hacker N, Schweighofer N, Trummer O, *et al.* Osteocalcin is not a strong determinant of serum testosterone and sperm count in men from infertile couples. *Andrology* 2013;1(4):590-4.
11. Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, *et al.* Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J Clin Invest* 2013;123(6):2421-33.
12. Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Mohammadi-asl J. Melatonin improves spermatogonial stem cells transplantation efficiency in azoospermic mice. *Iran J Basic Med Sci* 2014;17(2):93.
13. Mallick C, Mandal S, Barik B, Bhattacharya A, Ghosh D. Protection of testicular dysfunctions by MTEC, a formulated herbal drug, in streptozotocin induced diabetic rat. *Biol Pharm Bull* 2007;30(1):84-90.
14. Dehghani F, Hassanpour A, Poost-pasand A, Noorafshan A, Karbalay-Doust S. Protective effects of L-carnitine and homogenized testis tissue on the testis and sperm parameters of busulfan-induced infertile male rats. *Iran J Reprod Med* 2013;11(9):693-704.
15. Oury F. A crosstalk between bone and gonads. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1260(1):1-7.
16. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, *et al.* A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(5):1327-32.
17. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2005;34(4):1015-30.
18. Oury F, Sumara G, Sumara O, Ferron M, Chang H, Smith CE, *et al.* Endocrine regulation of male fertility by the skeleton. *Cell* 2011;144(5):796-809.



19. Oury F, Khrimian L, Denny CA, Gardin A, Chamouni A, Goeden N, *et al.* Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 2013;155(1):228-41.
20. Oury F, Yadav VK, Wang Y, Zhou B, Liu XS, Guo XE, *et al.* CREB mediates brain serotonin regulation of bone mass through its expression in ventromedial hypothalamic neurons. *Genes Dev* 2010;24(20):2330-42.
21. Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000;106(12):1553-60.
22. Hughes DE, Dai A, Tiffée JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- $\beta$ . *Nat Med* 1996;2(10):1132-6.
23. Khosla S, Melton III LJ, Atkinson EJ, O'fallon W. Relationship of serum sex steroid levels to longitudinal changes in bone density in young versus elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(8):3555-61.
24. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocr Rev* 2004;25(3):389-425.
25. Liao M, Guo X, Yu X, Pang G, Zhang S, Li J, *et al.* Role of metabolic factors in the association between osteocalcin and testosterone in Chinese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):3463-9.
26. Samavat J, Facchiano E, Cantini G, Di Franco A, Alpigiano G, Poli G, *et al.* Osteocalcin increase after bariatric surgery predicts androgen recovery in hypogonadal obese males. *Int J Obes* 2014;38(3):357-63.
27. Karsenty G, Oury F. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Mol Cell Endocrinol* 2014;382(1):521-6.



## The effect of osteocalcin on testis morphometry in azoospermic Syrian male NMRI

Mahsa Yaghoobinejad, Somayeh Solhjoo, Toolee Heidar, Alieh Bashghareh, Aliasghar Nohesara, Tayebeh Rastegar\*

Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Original Article

**Received:** Jun 23, 2017

**Accepted:** Des 30, 2018

**\*Corresponding Author:**

Tayebeh Rastegar,  
Department of Anatomy,  
Faculty of Medicine, Tehran  
University of Medical  
Sciences, Tehran, Iran.

**TEL:** +21 88953008

**Email:**

trastegar@sina.tums.ac.ir

### ABSTRACT

#### Introduction

The aim of this study was to evaluate the protective effect of osteocalcin on testis tissue in adult azoospermic mice.

#### Method and materials

25 Adult male mice were divided into five groups: the control group received normal saline for two months, PBS- DMSO group (received DMSO and after 5 weeks they received PBS for 30 days), and busulfan group received a single dose of 40mg/kg busulfan intra-peritoneally, and busulfan-PBS group received 40mg/kg busulfan and after 5 weeks PBS daily for a month, and the busulfan-osteocalcin group received 3ng/g/d osteocalcin, daily for one month, 5 weeks after a single dose of busulfan. Finally, after removal of the testis, tissues were fixed in bouin solution and stained by H&E. the sections were evaluated, and morphometric tests were done.

#### Results

No significant reduction was found in body weights of the groups, however left testis weight in osteocalcin group showed significant raise in comparison with azoospermic group ( $P<0.05$ ). More over, significant increase in seminiferous tubule diameter was observed in the osteocalcin group in comparison with ( $P<0.05$ ). Testicular epithelium height was significantly increased in the osteocalcin group in comparison with azoospermic group ( $P<0.05$ ). There weren't any significant changes in sertoli, leidyg, myoid counting among all the groups. The total number of spermatocyte, round spermatid, elongated spermatid and spermatogonia cells showed significant increase in osteocalcin group in comparison with busulfan and busulfan-PBS groups ( $P<0.05$ ).

#### Conclusion

Osteocalcin can improve the cytotoxic effect of busulfan on spermatogenic cells, also can improve spermatogenesis

#### Keywords

osteocalcin, testis morphometry, azoospermy, busulfan

► **Please cite this article as:** Yaghoobinejad M, Solhjoo S, Heidar T, Bashghareh A, Nohesara AA, Rastegar T. The effect of osteocalcin on testis morphometry in azoospermic Syrian male NMRI. J Neyshabur Univ Med Sci 2019;7(1):98-111.